

DOCKET NO.: 273243US 0PCT

10/538882  
JC17 Rec'd PCT/PTO 14 JUN 2005

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Syunichirou OSHIMA, et al.  
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION  
FILED: HERewith  
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/16180  
INTERNATIONAL FILING DATE: December 17, 2003  
FOR: VACCINE FOR COLD-WATER DISEASE IN FISH

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NO</u> | <u>DAY/MONTH/YEAR</u> |
|----------------|-----------------------|-----------------------|
| Japan          | 2002-366769           | 18 December 2002      |

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/16180. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number  
**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

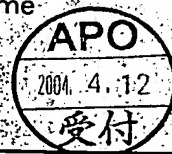
From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA  
PATENT OFFICE  
Kyodo Bldg.  
3-6, Nihonbashiningyocho 1-Chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0013  
Japan



|  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>31 March 2004 (31.03.2004)       |   |  |  |
| Applicant's or agent's file reference<br>TNS0001                     | IMPORTANT NOTIFICATION  |  |  |
| International application No.<br>PCT/JP2003/016180                   | International filing date (day/month/year)<br>17 December 2003 (17.12.2003) |  |  |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>18 December 2002 (18.12.2002)             |  |  |
| Applicant<br>TECHNO NETWORK SHIKOKU CO., LTD. et al                  |   |  |  |

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u>     | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office<br/>or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt<br/>of priority document</u> |
|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 18 Dec 2002 (18.12.2002) | 2002-366769                     | JP  | 18 Marc 2004 (18.03.2004)                       |

|  |  |
|--|--|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br><br>Facsimile No. (41-22) 338.70.10 | Authorized officer<br><br>Emmanuel BERROD (Fax 338 7010)<br><br>Telephone No. (41-22) 338 8389 |
|--|--|

RECEIVED

18 MAR 2004

JP 03/16180

WIPO

PCT

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

17.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 2 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 3 6 6 7 6 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 3 6 6 7 6 9 ]

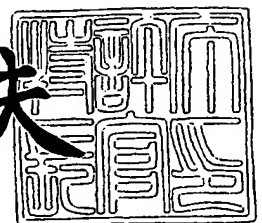
出 願 人                      株式会社テクノネットワーク四国  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年    3 月    4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 3 8 4 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 P06101412

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 高知県南国市物部乙 2 0 0 高知大学農学部水族病理学  
内

【氏名】 大島 俊一郎

【発明者】

【住所又は居所】 高知県南国市物部乙 2 0 0 高知大学農学部水族病理学  
内

【氏名】 近藤 基樹

【発明者】

【住所又は居所】 高知県南国市物部乙 2 0 0 高知大学農学部水族病理学  
内

【氏名】 川合 研兒

【特許出願人】

【識別番号】 501103000

【氏名又は名称】 株式会社テクノネットワーク四国

【特許出願人】

【識別番号】 000176419

【氏名又は名称】 三鷹製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 魚類冷水病ワクチン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を有効成分とする魚類冷水病ワクチン。

【請求項 2】 フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を含有する魚類冷水病ワクチン組成物。

【請求項 3】 フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分の有効量を投与することを特徴とする魚類冷水病の予防法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、魚類冷水病ワクチン及びこれを用いた魚類冷水病の予防法に関する

。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

冷水病は、サケ、マス、アユ、フナ等に低水温期に発病する病気である。もとは北米のマス類の病気で、低水温期の稚魚に発生し死亡率が高い病気である。死亡率は 2 0 ～ 5 0 % であるが、死亡しない魚でも体表に潰瘍などの後遺症が残るという問題がある。

【0 0 0 3】

冷水病の治療手段としては、水温を上昇させる、スルフィソゾールナトリウムの経口投与等が行なわれているが、水温を 2 5 ℃ 以上に上昇させるのは経済的に負担が大きすぎ、薬物投与は食用魚としては好ましくない。

【0 0 0 4】

冷水病の原因菌はフラボバクテリウム サイクロフィラム (Flavobacterium psychrophilum) であることが判明している。しかし現在までこれに対するワクチンは開発されていない。なお、フラボバクテリウム サイクロフィラムは、フレキシバクター サイクロフィルス、又はサイトファーガー サイクロフィルスと

呼ばれることもある。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は魚類冷水病ワクチンを提供することにある。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

そこで本発明者は冷水病の原因菌であるフラボバクテリウム サイクロフィラムの各種培養条件による病原性及びワクチン活性について検討してきたところ、全く意外にも定常期の菌体よりも対数増殖期の菌体を用いた場合に特にワクチン活性が高いことを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0007】

すなわち本発明は、フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を有効成分とする魚類冷水病ワクチンを提供するものである。

#### 【0008】

また本発明は、フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を含有する魚類冷水病ワクチン組成物を提供するものである。

#### 【0009】

さらに本発明は、フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分の有効量を投与することを特徴とする魚類冷水病の予防法を提供するものである。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のワクチンは、フラボバクテリウム サイクロフィラム（以下、本菌とすることがある）の対数増殖期の不活化菌体又はその成分を用いる。通常、細菌を培養した場合、誘導期、対数増殖期、定常期、死滅期及び生残期に分けられる。本発明者が本菌が魚類生体に侵入している様子を観察したところ、侵入している菌体表面に多くの小胞が観察された。一方、本菌の誘導期、対数増殖期及び定常期の菌体について SDS-PAGE による産生物の差異及び形態を観察したと

ころ、対数増殖期の菌体表面に小胞及び分泌物が存在することが明らかになった。

#### 【0011】

本発明のワクチンに用いる菌体は、本菌を常法により培養し、対数増殖期に採取することにより得られる。本菌の培養は、本菌を適当な培地に接種し常法に従って培養すればよい。培地中には、資化し得る炭素源及び窒素源を適当量含有させておくのが好ましい。

#### 【0012】

この炭素源及び窒素源については特に制限はないが、その例としては、窒素源としてトリプトン、各種動物血清、コーングルテンミール、大豆粉、コーンスチープリカー、カザミノ酸、酵母エキス、ファーマメディア、イワシミール、肉エキス、ペプトン、ハイプロ、アジパワー、コーンミール、ソイビーンミール、コーヒー粕、綿実油粕、カルチベータ、アミフレックス及びアジプロン、ゼスト、アジックスなどが挙げられる。また、炭素源としては、資化し得る炭素源、例えば、アラビノース、キシロース、グルコース、マンノース、蔗糖、麦芽糖、可溶性デンプン、乳糖、廃糖蜜や資化し得る有機酸、例えば酢酸等が挙げられる。また、その他、リン酸、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ などの無機塩や、必要であれば、無機、有機微量栄養源を培地中に適宜添加することもできる。またTY培地、サイトファーガー（CYT）培地等の市販の培地、改変サイトファーガー（MCYT）培地、及びこれらに牛胎児血清を添加した培地を用いることもできる。

#### 【0013】

培養条件は、pH6.8～7.8、4～20℃とするのが好ましい。

#### 【0014】

本菌が対数増殖期にあるか否かの確認は、600nmでの光学密度を測定することにより行なわれる。すなわち600nmでの光学密度が急激に上昇する時期が対数増殖期である。例えばpH7.3、15℃で培養した場合、培養20～30時間が対数増殖期である。

#### 【0015】



対数増殖期にある本菌を遠心分離、濾過等により分離するか、培養物をそのまま不活化する。不活化処理としては加熱処理、ホルマリン処理等が挙げられる。

#### 【0016】

本菌の成分には、菌体の膜成分、小胞及び分泌物が含まれる。これらの成分を採取するには、不活化菌体の超音波破碎等により行なうのが好ましい。

#### 【0017】

得られた不活化菌体又はその成分は、濾過、エバポレーション、濃縮、凍結乾燥等により濃縮して用いるのが好ましい。

#### 【0018】

本菌の不活化菌体又はその成分は、そのままワクチンとして使用してもよいが、薬学的に許容される液状又は固体状の担体とともにワクチン組成物として使用してもよい。当該ワクチン組成物の形態としては、経口投与用組成物、注射用組成物、魚類浸漬用組成物、飼料組成物等が挙げられる。液状の担体としては水、生理食塩水等が挙げられる固体状の担体としては、タルク、シュクロースなどの賦形剤が挙げられる。飼料組成物とするには、通常の魚類の飼料に本菌の不活化菌体又はその成分を混合すればよい。また、これらのワクチン組成物にはアジュバントを添加して抗原性を高めてもよい。

#### 【0019】

本発明のワクチン又はワクチン組成物の投与は、成魚でもよいが、冷水病に罹患する前、例えば稚魚の段階が好ましい。その投与量は、体重1kgあたり不活化菌体又はその成分として約1mg～5gが好ましい。投与回数は1回でもよいが、複数回、例えば2～10回が好ましく、また毎日投与でもよいが1～2日間隔をあけて投与してもよい。

#### 【0020】

本発明のワクチン又はワクチン組成物の対象魚類としては、本菌による冷水病になる魚類であれば制限されず、例えばアユ、フナ、ヤマメ、ニジマス、ギンザケ等のサケマス類等が挙げられる。

#### 【0021】

#### 【実施例】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

#### 【0022】

##### 実施例 1

(1) フラボバクテリウム サイクロフィラム G3724 (以下の実験でもこの株を使用した。) の一白金耳を 4mL の MCYT 培地 (トリプトン 2.0 g、酵母エキス 0.5 g、肉エキス 0.2 g、酢酸ナトリウム 0.2 g、塩化カルシウム 0.2 g、蒸留水 1000 mL、pH 7.2) に接種し、15℃ で 2 日間培養後、そのうちの 0.5 mL を 200 mL MCYT 培地に接種し、15℃ で振盪培養した。培養時間と菌体数及び 600 nm における光学密度との関係を図 1 に示す。図 1 から明らかなように、本菌は 0～24 時間までが誘導期であり、24～48 時間までが対数増殖期であり、48 時間以降が定常期であることがわかる。

#### 【0023】

(2) 本菌の各種培養条件による病原性の差異について検討した。すなわち、対数増殖期及び定常期の本菌を  $10^8 \sim 10^{10}$  CFU/mL となるようにアユの水槽に添加し、病原性を検討した。なお、対照としたアユは 0.5～5 g であり、水槽の温度は 15℃ とした。その結果、図 2 に示すように対照群 (非感染群) に比べて定常期の本菌感染群は 10 日目までの死亡率が 20～60% だったのに対し、対数増殖期の本菌感染群は 10 日目の死亡率が 100% であり、定常期の菌に比べて対数増殖期の菌の病原性が高いことが判明した。

#### 【0024】

(3) 段階の異なる本菌の菌体を超音波破碎した。その画分についてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE, 銀染色) を行なった。結果を図 3 に示す。その結果、対数増殖期に特異的に産生される物質 (図中の矢印) があることが判明した。

#### 【0025】

(4) 対数増殖期及び定常期の本菌についての走査型顕微鏡観察 (図 4) 及び透過型電子顕微鏡観察 (図 5) を行なった。その結果、対数増殖期には菌体表面に小胞が存在することが判明した。

## 【0026】

(6) 対数増殖期の本菌をアユに感染させ、本菌がアユの下あごに侵入している様子を走査型顕微鏡で観察した(図6)。その結果、小胞を有する対数増殖期にある本菌がアユ生体に侵入していることが判明した。

## 【0027】

## 実施例 2

フラボバクテリウム サイクロフィラム G3724 を 2000 mL 容坂口フラスコ中で 1000 mL MCYT 培地中 15℃ で培養した。OD600nm が 0.2 ~ 0.7 のものを対数増殖期菌体として用いた。すなわち、培養 24 ~ 36 時間の間の OD600nm が 0.2 ~ 0.7 の時期の培養物を、0.3% ホルマリン中で 15℃、2 日間インキュベーションして不活化菌体とし、次いで 4℃ で 8,000 ~ 10,000 ×g で遠心分離して不活化菌体とした。また、対照として培養 36 時間経過後 (OD600nm = 1.0) の培養物を同様に不活化して定常期不活化菌体を得た。

## 【0028】

## 実施例 3

フラボバクテリウム サイクロフィラム G3724 の一白金耳を 50 mL の MCYT 培地に接種し、15℃ で 48 時間予備培養した。このうち 2.5 mL を 1000 mL の MCYT 培地に接種し、15℃ で 36 時間培養した。このとき OD600nm は 0.2 ~ 0.7 であった。培養物を 0.3% ホルマリン中で 15℃、2 日間インキュベーションした。次いで、4℃ で 8,000 ~ 10,000 ×g で遠心分離して菌体を採取した。得られた菌体をさらに 0.3% ホルマリン生理食塩水に再懸濁し、本菌の不活化菌体を含むワクチン組成物を得た。

## 【0029】

## 実施例 4

平均体重 5.0 g のアユに、実施例 2 で得た対数増殖期及び定常期の菌体から得た不活化菌体を、0.1 FKCG/kg/day で経口投与した。

このように経口投与したアユに対して浸漬攻撃実験を行なった。その結果を表 1 に示す。

## 【0030】

【表1】

| 群      | 攻撃量(CFU/mL)       | 死亡／攻撃  | 生存率 (%)           |
|--------|-------------------|--------|-------------------|
| 対数増殖期群 | $1.7 \times 10^8$ | 39/152 | 74 <sup>a,c</sup> |
| 定常期群   | $1.9 \times 10^8$ | 39/105 | 63 <sup>b</sup>   |
| 対照群    | $2.2 \times 10^8$ | 82/165 | 50                |

a: 対照群に対して有意差あり (P<0.001) chi-square検定

b: 対照群に対して有意差あり (P<0.05)

c: 定常期群に対して有意差あり (P<0.05)

## 【0031】

表1より定常期群及び対数増殖期群ともに対照群に対して生存率に有意差があった。しかし、対数増殖期群の生存率は、定常期群のそれよりも有意に高く、対数増殖期群がワクチンとして特に有用であることが判明した。

## 【0032】

## 実施例5

実施例3で得たワクチン組成物を用いてワクチン効果を検討した。すなわち、攻撃試験開始5週間前からワクチンを2週間経口投与 (0.1 g/kg) を行ない、その後、3週間免疫活性を上昇させる為に通常飼料で飼育を行なった。その後、3週間後に攻撃試験を実施する区と、ワクチン投与終了から、7週後に攻撃試験を実施する2区を設定し、攻撃試験を実施した。

0.5 gのアユの2000尾に対して、ワクチンを毎日経口投与した区と、2週間で5回投与した (中2日で経口投与) 区の2区を設けた。結果を表2、図7及び図8に示す。

## 【0033】

【表 2】

|                  | 平均体重 (g) | 攻撃量 (CFU/mL)      | 死亡数/攻撃数 | 生残率 (%)           |
|------------------|----------|-------------------|---------|-------------------|
| 攻撃1 <sup>a</sup> |          |                   |         |                   |
| 1                | 1.7      |                   | 7/118   | 94.1 <sup>b</sup> |
| 2                | 1.8      | $4.4 \times 10^7$ | 4/119   | 96.6 <sup>b</sup> |
| 対照               | 1.8      |                   | 36/117  | 69.2              |
|                  |          |                   |         |                   |
| 1                | 1.9      |                   | 53/114  | 53.5 <sup>b</sup> |
| 2                | 1.8      | $1.2 \times 10^8$ | 10/120  | 91.7 <sup>b</sup> |
| 対照               | 1.9      |                   | 79/121  | 34.7              |
| 攻撃2 <sup>a</sup> |          |                   |         |                   |
| 1                | 2.7      |                   | 26/186  | 86.6 <sup>b</sup> |
| 2                | 2.9      | $2.1 \times 10^7$ | 20/168  | 88.1 <sup>b</sup> |
| 対照               | 2.7      |                   | 41/174  | 76.4              |
|                  |          |                   |         |                   |
| 1                | 2.7      |                   | 40/170  | 76.5 <sup>b</sup> |
| 2                | 3.0      | $1.4 \times 10^8$ | 36/165  | 78.8 <sup>b</sup> |
| 対照               | 3.2      |                   | 107/185 | 42.2              |

a: 攻撃1: ワクチン投与後3週後攻撃、攻撃2: ワクチン投与後7週後攻撃

b: 対照群に対して有意差あり (P<0.01)

1: 2週間毎日ワクチン投与群

2: 2週間で5回ワクチン投与群

## 【0034】

その結果、ワクチン投与3週間後に攻撃試験を実施した結果では、ワクチン投与区と対照区では有意差が認められた。また、5回だけ投与した区は、毎日投与した区よりもワクチン効果が非常に高いことが明らかとなった。

さらに、ワクチン投与後、7週間で攻撃試験を実施した場合、ワクチンを投与した両区において対照区よりも有意にワクチン効果が高かった。

## 【0035】

本試験期間中に死亡した供試魚について、本菌による死亡か否かを確認した結果、図9及び図10に示すように、死亡魚全てについて冷水病の典型的な症状が認められ、さらに、蛍光抗体法により死亡魚を診断した結果、検査した全ての個体で陽性に染色されたことから、本試験期間中に死亡した試験魚は、本菌の感染を原因とするものであることが明らかになった。

## 【0036】

**【発明の効果】**

本発明のワクチンを用いれば、サケ、マス、アユ等の冷水病が効率的に防止できる。

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

本菌の培養時間と 600 nm における光学密度 (OD) 及び菌数 (CFU/mL) との関係を示す図である。

**【図 2】**

本菌の培養条件によるアユに対する病原性 (累積死亡率) を示す図である。

**【図 3】**

本菌の菌体成分の SDS PAGE 分析結果を示す図である。

**【図 4】**

本菌の対数増殖期 (36 h, A 及び B) と定常期 (48 h, C 及び D; 72 h, E 及び F) の菌体の走査型顕微鏡像 (A、C、E = 20,000 倍, B、D、F = 100,000 倍) を示す図である。

**【図 5】**

本菌の対数増殖期における菌体の超薄切片の透過型電子顕微鏡像を示す図である。

**【図 6】**

本菌がアユの下あごに感染した様子を走査型顕微鏡像で示す図である。

**【図 7】**

攻撃 1 (ワクチン投与 3 週後攻撃) における生残率を示す図である。

**【図 8】**

攻撃 2 (ワクチン投与 7 週後攻撃) における生残率を示す図である。

**【図 9】**

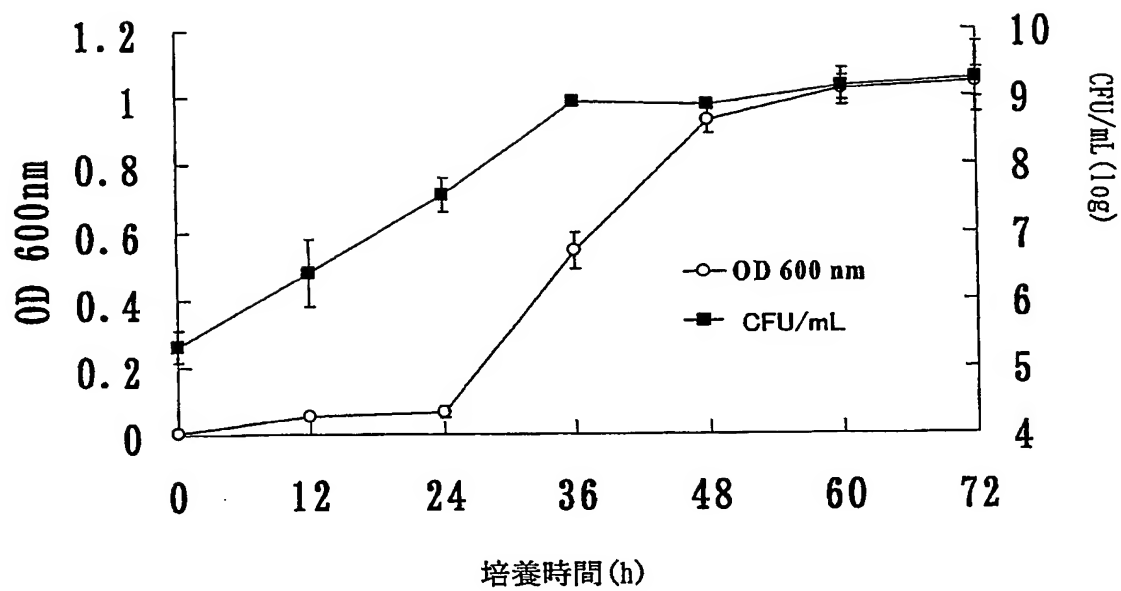
死亡したアユの症状を示す図である (矢印部は、冷水病特有の症状を示す)。

**【図 10】**

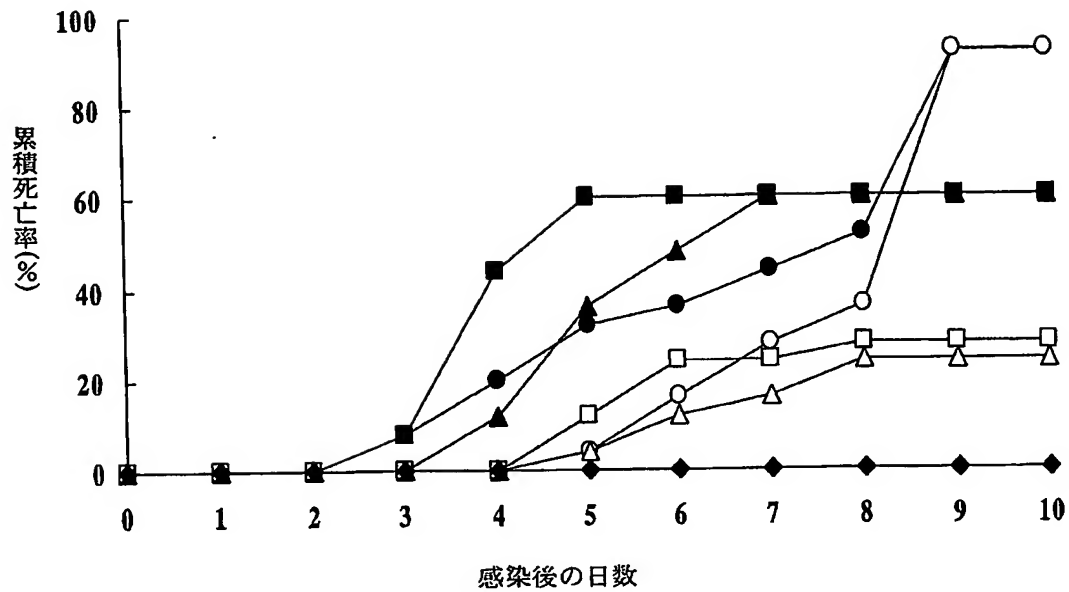
死亡したアユの蛍光抗体法による本菌の感染の有無についての診断結果を示す図である (矢印部が本菌の感染部)。

【書類名】 図面

【図 1】



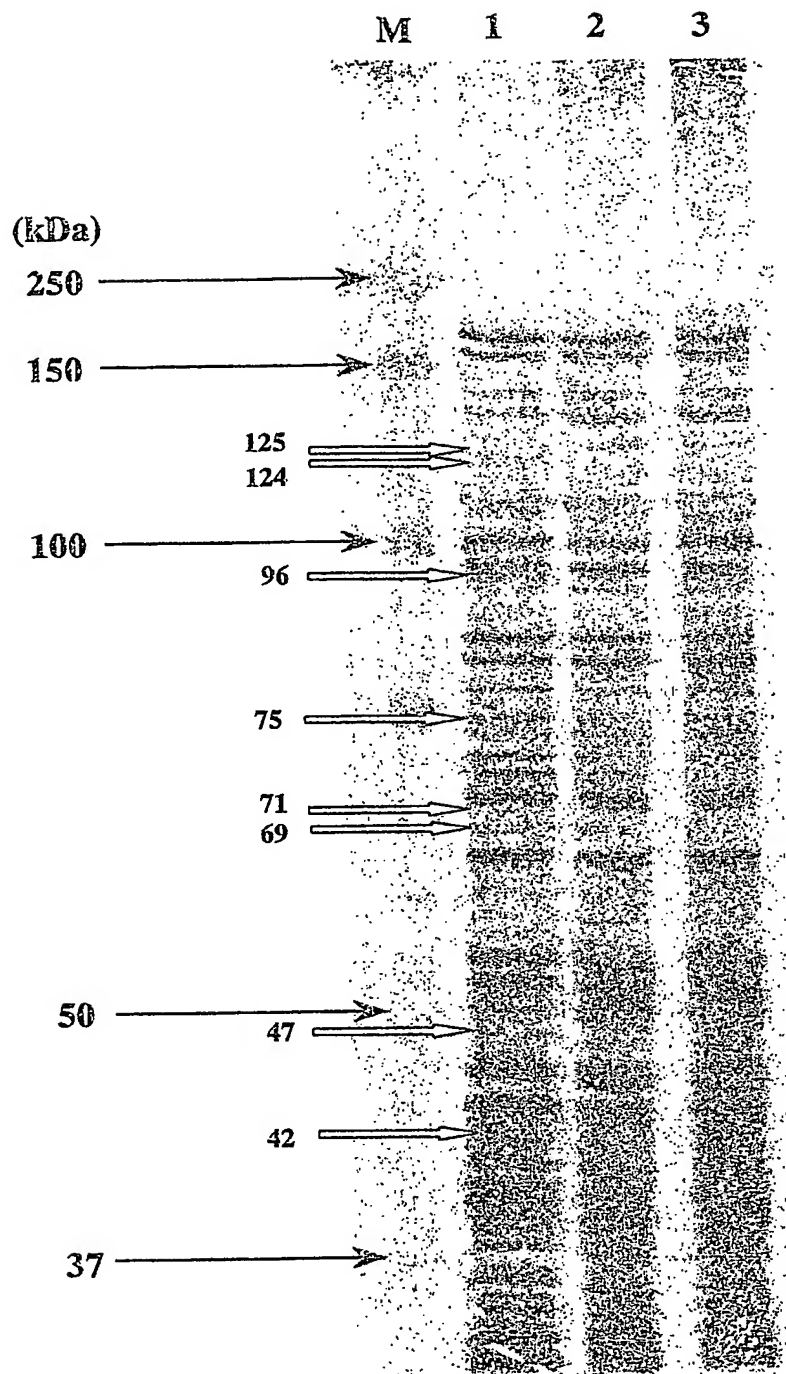
【図2】



- : 対数増殖期(36h,  $10^{9.5}$ CFU/mL)
- : 対数増殖期(36h,  $10^{8.5}$ CFU/mL)
- ▲: 定常期(48h,  $10^{9.9}$ CFU/mL)
- △: 定常期(48h,  $10^{8.9}$ CFU/mL)
- : 定常期(72h,  $10^{10.2}$ CFU/mL)
- : 定常期(72h,  $10^{9.2}$ CFU/mL)
- ◆: 対照群(非感染群)



【図 3】



M: 分子量マーカー

レーン 1: 対数増殖期(36h)

レーン 2: 定常期(48h)

レーン 3: 定常期(72h)

矢印: 対数増殖期に特異的なバンド

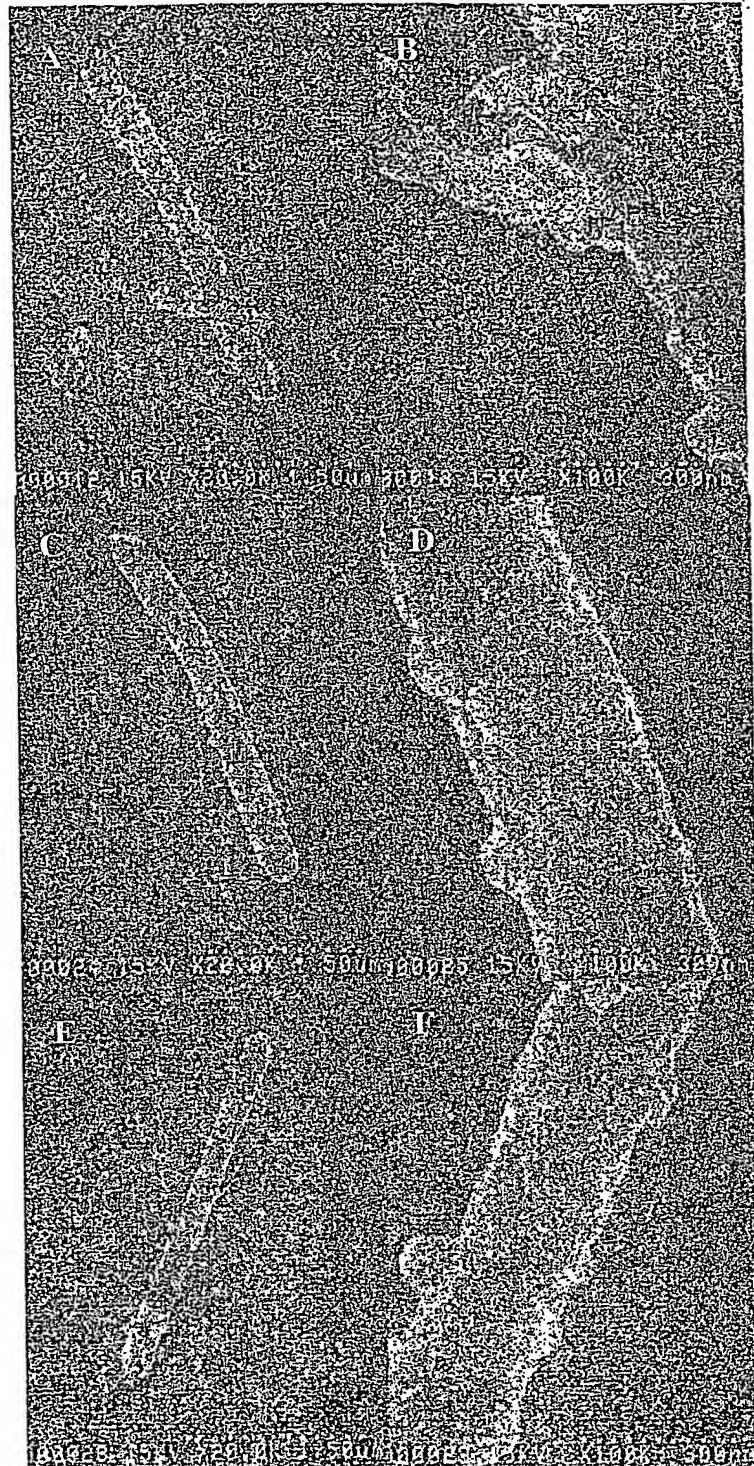
BEST AVAILABLE COPY

【図 4】

対数増殖期 (36h)

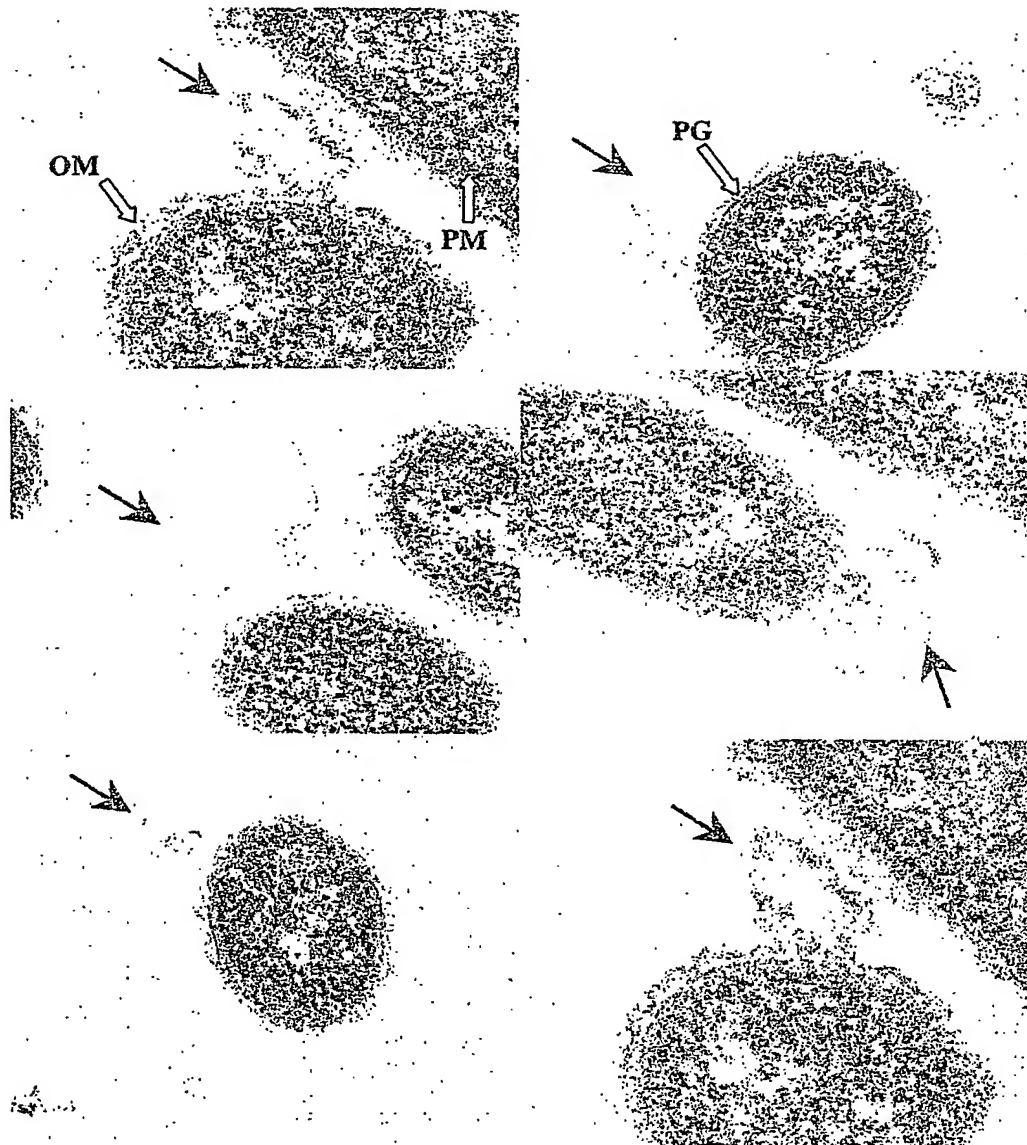
定常期 (48h)

定常期 (72h)



BEST AVAILABLE COPY

【図 5】



OM: 外膜  
 PG: ペプチドグリカン層  
 PM: プラズマメンブラン  
 矢印: 細胞表面の突起

BEST AVAILABLE COPY

【図 6】



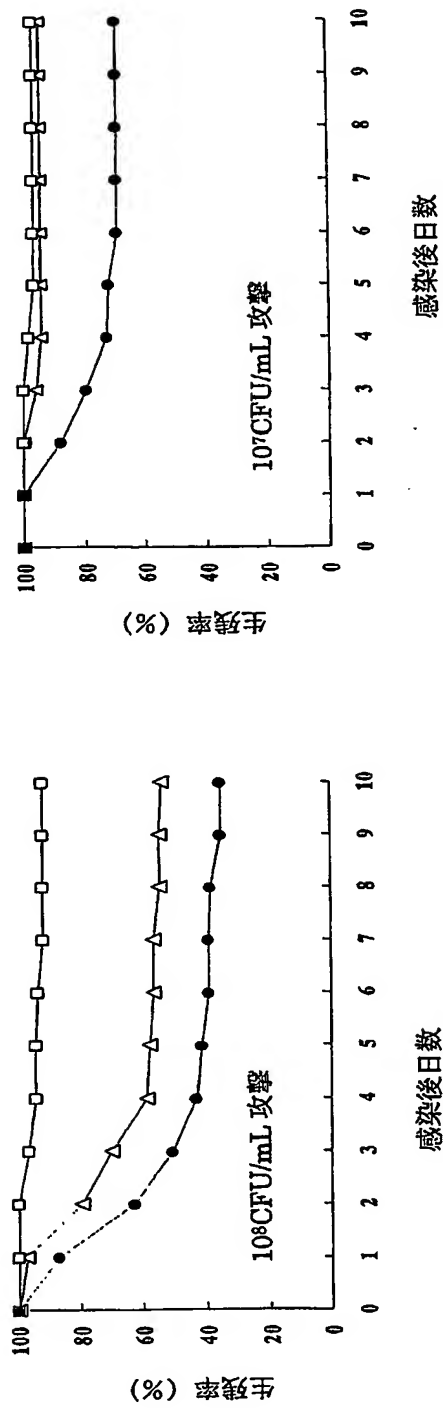
A=2,500 倍

B=20,000 倍

BEST AVAILABLE COPY

【図 7】

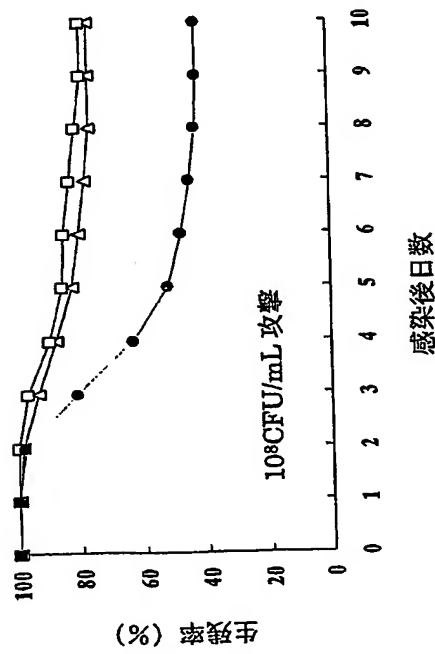
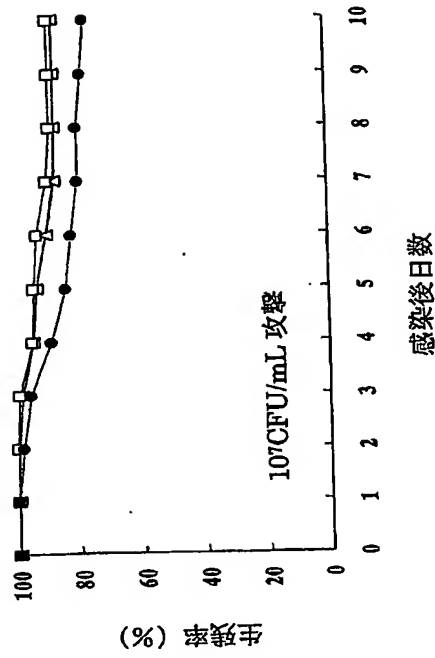
攻撃 1 (ワクチン投与 3 週後)



△: 毎日投与  
□: 2週間で5日投与  
●: 対照群

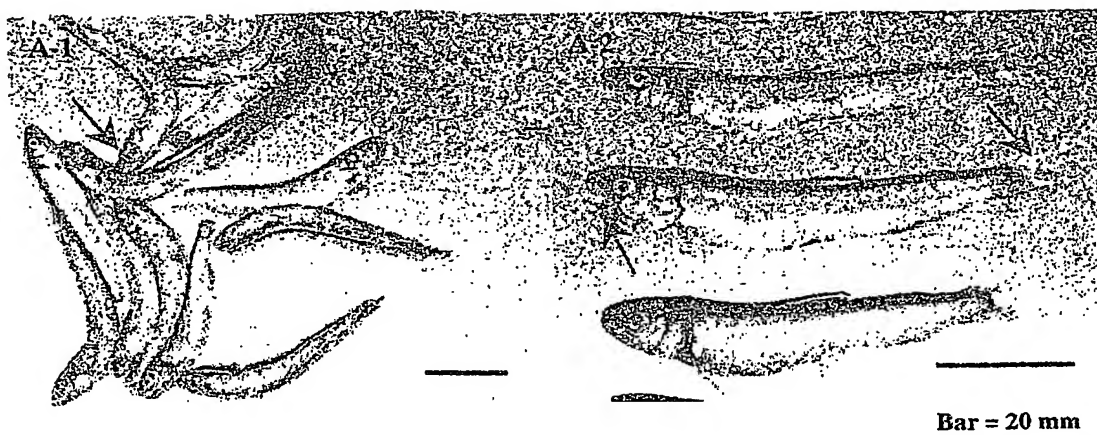
【図 8】

攻撃2(ワクチン投与7週後)

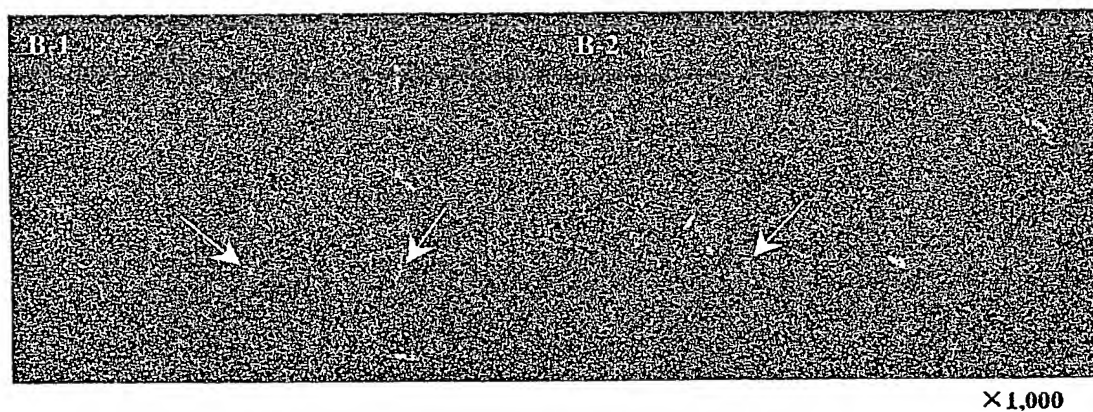


△: 毎日投与  
□: 2週間で5日投与  
●: 対照群

【図 9】



【図 10】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 冷水病ワクチンの提供。

【解決手段】 フラボバクテリウム サイクロフィラムの対数増殖期の不活化菌体又はその成分を有効成分とする魚類冷水病ワクチン。

【選択図】 なし



認定・付加情報

|         |                |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2002-366769 |
| 受付番号    | 50201918001    |
| 書類名     | 特許願            |
| 担当官     | 第六担当上席 0095    |
| 作成日     | 平成14年12月19日    |

<認定情報・付加情報>

|       |             |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成14年12月18日 |
|-------|-------------|

次頁無

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 【書類名】    | 出願人名義変更届        |
| 【あて先】    | 特許庁長官 殿         |
| 【事件の表示】  |                 |
| 【出願番号】   | 特願2002-366769   |
| 【承継人】    |                 |
| 【識別番号】   | 501103000       |
| 【氏名又は名称】 | 株式会社テクノネットワーク四国 |
| 【承継人代理人】 |                 |
| 【識別番号】   | 110000084       |
| 【氏名又は名称】 | 特許業務法人アルガ特許事務所  |
| 【代表者】    | 高野 登志雄          |
| 【手数料の表示】 |                 |
| 【予納台帳番号】 | 164232          |
| 【納付金額】   | 4,200円          |

## 認定・付加情報

|         |                |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2002-366769 |
| 受付番号    | 50302056915    |
| 書類名     | 出願人名義変更届       |
| 担当官     | 岩谷 貴志郎 7746    |
| 作成日     | 平成16年 1月30日    |

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】 平成15年12月15日

## 【承継人】

【識別番号】 501103000

【住所又は居所】 香川県高松市丸の内2番5号

【氏名又は名称】 株式会社テクノネットワーク四国

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 110000084

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

特願 2002-366769

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501103000]

1. 変更年月日 2001年 3月14日

[変更理由] 新規登録

住 所 香川県高松市丸の内2番5号

氏 名 株式会社テクノネットワーク四国

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000176419]

1. 変更年月日

1990年 8月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都三鷹市下連雀4丁目16番39号

氏 名

三鷹製薬株式会社